

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SUBSTANTIALLY PURE MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING URICASE

Patent Number: JP9154581
Publication date: 1997-06-17
Inventor(s): SUZUKI YASUSHI
Applicant(s): ASAHI CHEM IND CO LTD
Requested Patent: ☐ JP9154581
Application: JP19950316359 19951205
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09; C07H21/04; C12N1/21;
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new microorganism, belonging to *Escherichia coli* transformed with a recombinant vector having a base sequence capable of coding a specific amino acid sequence and producing a uricase useful for measuring the uric acid concentration in a humor and a reagent, etc., for dyeing hair.

SOLUTION: This microorganism is a substantially pure new microorganism *Escherichia coli* DH1-pV0D2 (FERM P-15308), belonging to *Escherichia coli* transformed with a recombinant vector having a base sequence capable of coding an amino acid sequence at the 1st to the 302nd positions of an amino acid sequence represented by the formula and is capable of producing a uricase useful for measuring the content of uric acid in blood or urine or as a reagent for dyeing hair. The microorganism is obtained by screening a chromosomal DNA library of a microorganism belonging to the genus *Arthrobacter*, integrating the resultant gene capable of coding the uricase into a vector, preparing a recombinant plasmid and transducing the prepared recombinant plasmid into a microorganism belonging to the *Escherichia coli*.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-154581

(43) 公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4 B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
9/06			9/06	A
// (C 1 2 N 15/09	Z N A			

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-316359	(71) 出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 出願日	平成7年(1995)12月5日	(72) 発明者	鈴木 康司 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭 化成工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 ウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物

(57) 【要約】

【課題】 尿酸の定量に有用なウリカーゼを効率よく生産する微生物を開発し、この微生物を用いて該酵素を量産する方法を提供する。

【解決手段】 アースロバクター属由来のウリカーゼ遺伝子のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えプラスミドによって形質転換されたエッシャーヒア・コリに属する微生物であるウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物、そのウリカーゼを発現する実質上純粋なDNAおよびウリカーゼの製造方法である。

【効果】 アースロバクター属に属するウリカーゼを発現する遺伝子DNAをスクリーニングし、これを用いて構築された発現ベクターの組換えプラスミドを例えばエッシャーヒア・コリに属する微生物に導入することによって、形質転換微生物は効率よくウリカーゼを生産することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えベクターによって形質転換されたエッシャーヒア・コリに属する微生物であることを特徴とするウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物。

【請求項2】 形質転換されたエッシャーヒア・コリに属する微生物が、ベクタープラスミドpUOD2によって形質転換されたものである請求項1記載の微生物。

【請求項3】 ベクタープラスミドpUOD2によって形質転換されたエッシャーヒア・コリに属する微生物が、エッシャーヒア・コリ-DH1-pUOD2 (*Escherichia coli* DH1-pUOD2: FERM P-15308)である請求項2記載の微生物。

【請求項4】 配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするウリカーゼを発現する実質上純粋なDNA。

【請求項5】 塩基配列が、配列表の配列番号1における塩基配列の31位から936位で表される塩基配列である請求項4記載のDNA。

【請求項6】 アースロバクター属由来のウリカーゼ遺伝子を有する組換えプラスミドによって形質転換された微生物であるウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からウリカーゼを採取することを特徴とするウリカーゼの製造方法。

【請求項7】 配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えベクターによって形質転換された微生物であるウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からウリカーゼを採取することを特徴とするウリカーゼの製造方法。

【請求項8】 形質転換された微生物が、ベクタープラスミドpUOD2によって形質転換された微生物である請求項7記載のウリカーゼの製造方法。

【請求項9】 ベクタープラスミドpUOD2によって形質転換された微生物が、エッシャーヒア・コリ-DH1-pUOD2 (*Escherichia coli* DH1-pUOD2: FERM P-15308)である請求項8記載のウリカーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物、ウリカーゼを発現する実質上純粋なDNA及びウリカーゼの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 ウリカーゼ (EC 1. 7. 3. 3)

は、1モルの水分及び1モルの酸素の存在下で1モルの尿酸を酸化して最終的に1モルのアラントインと1モルの過酸化水素及び1モルの二酸化炭素を生成する反応を触媒する酵素であり、血中あるいは尿中の尿酸含有量の測定や、染毛用試薬としても使用される。

【0003】 ウリカーゼは、微生物、動物等に広く存在し、例えばアースロバクター属 (*Biochim. Biophys. Acta*, vol. 151, 54 (1968))、セルロモナス属 (特開平6-38766号公報)、キャンディグ属 (特開平5-317055号公報)、バチルス属 (特開平2-53488号公報) など数多くの報告があり、上記のセルロモナス属、キャンディグ属、バチルス属では遺伝子配列の情報も知られている。

【0004】 その中でも、アースロバクター・グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) B-0577 (通商産業省工業技術院微生物工業研究所 (現・生命工学技術研究所) 寄託番号・微工研条寄第360、FERM BP-360; 以下、アースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360と略す) 株の産生するウレアーゼは、基質特異性、熱安定性にも優れ、既に臨床診断用、工業用酵素として広く利用されている。しかしながらアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株が産生するウリカーゼ量が著しく低いいため遺伝子組換え技術を用いた高生産法の開発が待たれていた。

【0005】 そこで、アースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株のウリカーゼ遺伝子を取得しようとし、この株のウリカーゼのDNA塩基配列、アミノ酸配列の情報検索を試みたが、他のアースロバクター属さえもウリカーゼについての情報が報告されていない。即ち、アースロバクター属のウリカーゼがどのようなアミノ酸配列であるかは全く推定できないものであった。

【0006】 このような状況下、反応性、安定性が共に高く、尿酸の測定に有効であるアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株由来のウリカーゼにおいては生産性が低いことから、遺伝子工学等を用い、効率よくこの酵素を生産する微生物の開発が望まれていたが、本ウリカーゼを構成するポリペプチドの一次構造及び該酵素のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列については未だ発表されていない。

【0007】 従って、ウリカーゼを構成するポリペプチドの一次構造の決定、該酵素のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列の決定及び遺伝子工学による該酵素の生産が望まれていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、このような実情のもとで、少なくとも尿酸の定量に有用なウリカーゼを効率よく生産する微生物を開発し、この微生物を用

いて該酵素を量産する方法を提供することを目的と
なされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は前記目的を達成するために鋭意研究を重ね、公知のウリカーゼの部分的なアミノ酸配列から種々プローブを作成したが目的とするクローンを得られず、さらに研究した結果、ウリカーゼを生産する微生物由来の染色体DNAライブラリーの中から、該酵素を発現する遺伝子DNAをスクリーニングし、次いでこのDNAを用いて発現ベクターを構築したのち、例えばエッシャーヒア・コリー (*Escherichia coli*; 以下E. coli、もしくは大腸菌と略称することがある) に属する微生物に導入して形質転換微生物を作出し、これを培地中で培養することによって、該ウリカーゼを効率よく量産することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は、ウリカーゼを発現するDNAを有する組換えプラスミドによって形質転換されたE. coliに属する微生物であることを特徴とするウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物、配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位に相当する図1で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするウリカーゼを発現する実質上純粋なDNA、及び前記の形質転換された微生物であるウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からウリカーゼを採取することとを特徴とするウリカーゼの製造法を提供するものである。

【0011】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、ウリカーゼを生産する形質転換された微生物を作出するのに用いられるウリカーゼを発現する遺伝子DNAは、例えば該酵素を生産する微生物由来の染色体DNAライブラリーの中から、スクリーニングすることによって得ることができる。

【0012】本発明においては、前記のウリカーゼを生産する微生物として、アースロバクター属が好ましく用いられ、更にアースロバクター・グロビホルミスFERMBP-360株がより好ましく用いられる。このアースロバクター・グロビホルミスFERMBP-360株の染色体DNAライブラリーから該酵素を発現する遺伝子DNAをスクリーニングする方法の具体例について説明すると、まず、該微生物の染色体DNA100~2000μg程度を通常用いられている方法によって抽出する。

【0013】次に、ウリカーゼをコードする遺伝子DNAを組み込んだプラスミドを構築する。このライブラリー作製ベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。前者のファージとして

は、例えばE. coliを宿主微生物とする場合には、λgt10・λC、λgt10・λBなどが用いられる。また、プラスミドとしては、E. coliを宿主微生物とするに、例えばpBR322、pBR325、pACYC184、pKN17、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、ブルースクリプトシリーズベクターなどが用いられる。さらに、バチルス属を宿主微生物とする場合は、例えばpHY300PLKなどを用いればよく、サッカロミセス属を宿主微生物とする場合は、例えばpYC1などを用いればよい。

【0014】これらのベクターに、該ウリカーゼ遺伝子DNAを組み込む方法については特に制限はなく、従来慣用されている方法を用いることができる。例えば先に抽出した該微生物の染色体DNA1~10μg程度を適当な制限酵素を用い、同様にライブラリー作製ベクター1~10μg程度も適当な制限酵素を作用させたのち、それぞれの接着末端をアニーリング後、適当なDNAリガーゼを用いて結合させ、目的の宿主微生物に形質転換させることによって、染色体DNAライブラリーが得られる。

【0015】この際用いられる宿主微生物としては、E. coliがよく使用され、例えばE. coli DH1株、E. coli W3110株、E. coli C600株など、バチルス属に属する宿主微生物としては例えばバチルス・ズブチリスISW1214株、サッカロミセス属に属する宿主微生物としては例えばサッカロミセス・セレビジアAH22株などが挙げられ、また構築されたプラスミドをE. coliに属する微生物や他の微生物に導入する方法としては、コンピテントセル法を用いてもよく、あるいはカルシウムイオンの存在下に組換えDNAの導入を行ってもよい。また宿主微生物への所望組換えDNA導入の有無の選択については、組換えDNAを構成するベクターの薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で、該宿主微生物を培養し、生育する宿主微生物を選択すればよい。

【0016】一方、ウリカーゼ精製製品のN末端側アミノ酸配列、エンドプロテイナーゼ・Asp-N (アスパラギン酸-N) 処理断片アミノ酸配列を決定し、これに基づいて種々のオリゴヌクレオチドを合成した後、例えばアイソトープで標識して放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製する。次いで、これらの放射性オリゴヌクレオチドプローブを用い、従来慣用されている方法に従って、前記の染色体DNAライブラリーの中から、ウリカーゼを発現する遺伝子を持つ組換え体大腸菌をスクリーニングするが、この段階が本発明において非常に困難な部分であり、ウリカーゼの部分的なアミノ酸配列から種々のプローブを作製したが、ウリカーゼ遺伝子を保持するクローンを見い出せなかった。

【0017】具体的に述べるとプローブを設計する場

合、一般に推定されるDNA配列の組合せがなるべく少ない配列を選択してプローブを合成するが、本発明のウリカーゼの場合、組合せの少ない配列が余り存在しない。発明の実施の形態で更に詳しく述べているが、アースロバクターの遺伝子のコドン使用頻度を参考にして数多い組合せの中から組合せを絞ったプローブを作製しようとして情報を収集しようとしたが、アースロバクターの遺伝子のコドン使用頻度をまとめた資料は検索できなかった。複数の推定される部分の塩基をインシンにしたプローブを作製した配列番号2および3に示されるウリカーゼ遺伝子プローブUODaおよびUODbでもクロニングが達成されなかった。

【0018】また配列番号4から7に示されるウリカーゼ遺伝子プローブUODc、UODd、UODe、UODfで示されるようなプローブの長さ、組み合わせ状態についても種々検討し、さらにハイブリダイゼーション、及びその後の洗浄の条件（溶液の組成、温度、時間）を種々検討した結果、後の発明の実施の形態で述べるが、本発明においてはエンドプロテイナーゼ・Asp-N処理断片のアミノ酸配列に基づく放射性オリゴヌクレオチドプローブを用い、特定の条件でハイブリダイゼーション、洗浄を行って釣り上げられた組換え体大腸菌が、目的の遺伝子DNAを持つものであることが判明した。

【0019】次に、この目的の遺伝子DNAを含む組換え体ライブラリーから、例えばマニアティス（Maniatis）らの方法（「モレキュラー・クロニング：コールドスプリングハーバー（Molecular Cloning: Cold Spring Harbor）」（1982年））などに従って、ウリカーゼ遺伝子を有するDNAを含む組換えベクタープラスミド（pUOD2と命名）を調製することができる。このプラスミドの構成を示す模式図を図4に示す。また、該プラスミド中のアースロバクター・グロビホルミスFERMBP-360株染色体DNA由来の部位の制限酵素地図は図3に示すとおりである。

【0020】ウリカーゼの発現には、このpUOD2を用いてもよく、さらにウリカーゼをコードしている遺伝子DNAを新たに組み込んだ発現ベクターを構築してもよい。この発現用ベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。前者のファージとしては、例えばE. coliを宿主微生物とする場合には、 λ gt \cdot λ C、 λ gt \cdot λ Bなどが用いられる。また、プラスミドとしては、E. coliを宿主微生物とするに、例えばpBR322、pBR325、pACYC184、pKN17、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、プルースクリプトシリウスベクターなどが用いられる。さらに、バチルス属を宿主微生物とする場合は、

例えばpHY300PLKなどを用いればよく、サッカロミセス属を宿主微生物とする場合は、例えばpYCl1などを用いればよい。

【0021】これらのベクターに、該ウリカーゼ遺伝子DNAを組み込む方法については特に制限はなく、従来慣用されている方法を用いることができる。例えば適当な制限酵素を用いて、前記のウリカーゼ遺伝子DNAを含む組換えプラスミドDNA及び該発現用ベクターを処理し、それぞれウリカーゼ遺伝子を含むDNA断片及びベクター断片を得たのち、それぞれの接着末端をアニーリング後、適当なDNAリガーゼを用いて結合させることによって、あらたな発現ベクターが得られる。

【0022】このようにして、構築されたプラスミドのE. coliへの導入および宿主微生物への所望組換えDNA導入の有無の選択については、前述した方法を用いればよい。本発明においては、前記組換えベクタープラスミドpUOD2によって形質転換されたE. coliに属する微生物は、エシェリヒア・コリDH1-pUOD2（Escherichia coli DH1-pUOD2: FERM P-15308）と命名される。

【0023】このようにして得られた形質転換微生物の培養は、該微生物の生育に必要な炭素源や窒素源などの栄養源や無機成分などを含む培地中において行うことができる。該炭素源としては、例えばグルコース、デンプン、ショ糖、モラッセス、デキストリンなどが、窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、カゼイン加水分解物、コーンスチーチリカー、硝酸塩、アンモニウム塩などが、無機成分としては、例えばナトリウム、カルシウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、鉄などの陽イオンや塩素、硫酸、リン酸などの陰イオンを含む塩が挙げられる。

【0024】培養方法については特に制限はなく公知の方法、例えば通気攪拌培養、振盪培養、回転培養、静置培養などの方法によって、通常20〜50℃、好ましくは25〜42℃、より好ましくは37℃近辺で、12〜48時間程度培養する方法が用いられる。このようにして培養を行ったのち、遠心分離処理などの手段によって菌体を集め、次いで酵素処理、自己消化、フレンチプレス、超音波処理などによって細胞を破壊して目的とする酵素を含有する抽出液を得る。この抽出液から、該酵素を分離、精製するには、例えば、塩析、脱塩、イオン交換樹脂による吸着処理などを行ったのち、さらに吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過、電気泳動法などによって精製すればよい。

【0025】この精製製品について、ウリカーゼの酵素活性及び物理化学的性質を調べることによって、該形質転換微生物がウリカーゼの産生能を有することが確認された。したがって、本発明において用いたウリカーゼを発現する遺伝子DNAは、図1で表されるアミノ酸配列

をコードする塩基配列を有し、かつその塩基配列が図2に示す配列であることが明らかである。

【0026】このようにして得られたウリカーゼは、アースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株のウリカーゼと同様な触媒作用、酵素学的性質を有していた。即ち1モルの酵素と1モルの水分子の存在下で、1モルの尿酸から最終的に1モルのアラントインと1モルの二酸化炭素と1モルの過酸化水素を生成させる反応を触媒し、SDS-ポリアクリルアミドゲルクロマト法での分子量が30,000±5,000であり、等電点が4.64±0.5であり、55℃までの熱安定性を有し、pH6.0~9.5までのpH安定性を有する、などである。

【0027】このことからこのようにして得られたウリカーゼは、例えば血清中の尿酸定量などの臨床用酵素として有用であるし、染毛試薬原料としても用いることができる。なお、本発明明細書に記載の塩基配列の記号及びアミノ酸配列の記号は、当該分野における慣用語号に基づくもので、それらの例を以下に列記する。また、すべてのアミノ酸はL体を示すものとする。

【0028】DNA：デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

S：グアニンまたはシトシン

R：アデニンまたはグアニン

W：アデニンまたはチミン

Y：チミンまたはシトシン

N：アデニン、チミン、グアニン、シトシンまたは他の塩基

Ala：アラニン

Arg：アルギニン

Asn：アスパラギン

Asp：アスパラギン酸

Cys：システイン

Gln：グルタミン

Glu：グルタミン酸

His：ヒスチジン

Ile：イソロイシン

Leu：ロイシン

Lys：リジン

Met：メチオニン

Phe：フェニルアラニン

Pro：プロリン

Ser：セリン

Thr：スレオニン

Trp：トリプトファン

Tyr：チロシン

Val：バリン

Xaa：不明または他のアミノ酸

【0029】

【発明の実施の形態】本発明は、配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えベクターによって形質転換されたエッシャーヒア・コリーに属する微生物であることを特徴とするウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物、配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするウリカーゼを発現する実質上純粋なDNA、配列表の配列番号1におけるアミノ酸配列の1位から302位で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する組換えベクターによって形質転換された微生物であるウリカーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からウリカーゼを採取することを特徴とするウリカーゼの製造方法である。

【0030】本発明における好適な態様としては、形質転換されたエッシャーヒア・コリーに属する微生物がベクタープラスミドpUOD2によって形質転換されたものである微生物であり、またベクタープラスミドpUOD2によって形質転換されたエッシャーヒア・コリーに属する微生物がエッシャーヒア・コリーDH1-pUOD2 (Escherichia coli DH1-pUOD2: FERMP-15308) である微生物であり、塩基配列が配列表の配列番号1における塩基配列の31位から936位で表される塩基配列であるDNAである。

【0031】次に、参考例及び発明の実施の形態によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によってなんら限定されるものではない。

【0032】

【参考例1】

染色体DNAの分離

アースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株を培地（酵母エキス0.5%、ペプトン0.5%、 K_2HPO_4 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、 NH_4Cl 0.05%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%、(pH7.0)）100mlにて30℃で24時間振盪培養した後、この培養液を高遠心冷却心機（トミーCX-250型）を用い、6500rpm（7660G）で10分間遠心分離処理して、菌体を集菌した。

【0033】次いで、この菌体を50mMトリス-塩酸（pH8.0）、50mM EDTA（エチレンジアミ

ン4酢酸・2ナトリウム) (pH8.0) 及び15%シェーククロスからなる溶液20mlに懸濁し、最終濃度が2mg/mlとなるようにリゾチム(生化学工業(株)社製)を加え、37℃で10分間処理して菌株の細胞壁を破壊した。

【0034】次に、これに10%ラウリル硫酸ナトリウム(シグマ社製)水溶液1mlを加えて、37℃で5分間処理した後、クロロホルム/フェノール(1:1)混合液21mlを加え攪拌後、10000rpm(12080G)で10分間遠心分離処理して水相を回収した。この水相に2倍量のエタノールを静かに混合し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながら、DNAをガラス棒にまきつけて分離した後、10mMトリス-塩酸(pH8.0)及び1mMのEDTAからなる溶液20mlで溶解し、最終濃度が10µg/mlとなるようにRNase(ファルマシア社製)を加えて37℃で30分処理をした。ついでこれに等量のフェノール/クロロホルム(1/1)混合液を加え、前記と同様に処理してそれぞれ水相を分取した。

【0035】次に、この水相に2倍量のエタノールを加えて前記の方法で再度DNAを分離した後、10mMトリス-塩酸(pH8.0)及び1mMのEDTAからなる溶液2mlに溶解した。

【0036】

【参考例2】

アースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株遺伝子ライブラリーの作製

参考例1で得られたアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株染色体5µgを、制限酵素BamHI(宝酒造社製)10単位を用い、10mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mMのNaCl、10mMのMgCl₂及び1mMのDTTからなる溶液中、37℃で4時間切断処理した。

【0037】一方、ベクタープラスミドpUC118(宝酒造社製)3µgを別の容器中で、制限酵素BamHI(宝酒造社製)10単位を用い、10mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mMのNaCl、10mMのMgCl₂及び1mMのDTTからなる溶液中で、37℃で4時間切断処理した後、5'末端を脱リン酸化するために、反応液にアルカリ性ホスファターゼ(宝酒造社製)1単位を加えて65℃で2時間処理した。

【0038】次に、前記のようにして得られた2種のDNA溶液を混合し、この混合液に等量のフェノール/クロロホルム(1/1)混合液を加えて処理した後、遠心分離処理によって水相を分取した。さらに、この水相に1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液および2倍量のエタノールを加えて遠心分離処理することによってDNAを回収し、減圧乾燥した。

【0039】そのDNAを10mMトリス-塩酸(pH8.0)及び1mMのEDTA溶液からなる溶液にて溶

解した後、66mMトリス-塩酸(pH7.6)、6.6mM MgCl₂、10mMのDTT及び660µMのATP(ペーリンガー・マンハイム社製)の存在下、T4DNAライゲース(宝酒造社製)300単位を用い、4℃で16時間ライゲーションを行った。

【0040】次にこれを、A. Mishimuraらの方法(Nucleic Acids Research 18巻、第6169ページ(1990年))によってコンピテント細胞としたE. coli DH1(ATCC33849)〔F⁻、recA1、endA1、gyrA96、thi-1、hsdR17(rk⁻、mk⁻)、SupE44、relA1、λ⁻〕〔「モレキュラー・クローニング：ゴールドスプリングハーバー(Molecular Cloning: Cold Spring Harbor)」504~506ページ(1982年)〕にトランスフォーメーションし、これをアンピシリン50µg/ml含有BHI寒天培地にて、37℃で一昼夜培養し、約10,000の形質転換微生物を得て、アースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株遺伝子ライブラリーとした。

【0041】

【実施例1】

放射性オリゴヌクレオチドプローブの作製

ウリカーゼ精製標品のエンドプロテイナーゼ・Asp-N処理断片のアミノ酸配列を調べたところ、図5に示す配列が決定された。この情報をもとに遺伝子の5'末端側から塩基配列を予想した。この予想された塩基配列には種々の組合せが考えられるので、組合せの数が少ない部分のオリゴヌクレオチドを設計して実験を行った。このオリゴヌクレオチドはアール・エル・レッシンジャーらの方法〔「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ(J. Am. Chem. Soc.)」第98巻、3655ページ〕に基づき、DNAシンセサイザー〔サイクロン(バイオサーチ社製)〕を用いて作製した。

【0042】まず図5のD-20アミノ酸配列で、1アミノ酸残基目のAspから6アミノ酸残基目のHisに対応する合成DNAを作製した。この組合せは17マーのものを考えた場合128通りも存在する。そこでアースロバクター遺伝子のコドン使用頻度を参考にして、使用頻度の高いコドンでオリゴヌクレオチドプローブを作製しようとした。種々の生物の遺伝子のコドン使用頻度をまとめているK. Wadaraのデータ(Nucleic Acids Research 20巻、第2114ページ、1992年)を参考にしようとしたが、アースロバクター由来の遺伝子情報は少なすぎて、Wadaraのデータにはアースロバクター属の情報は記載されていなかった。つまりコドン使用頻度を利用して組み合わせ数を少なくすることはできなく、すべての組み合わせによりオリゴヌクレオチドプローブを作製せざるを得なか

った。よってこのアミノ酸配列から推定されるmRNAに相補的な図6の①、配列番号2に示すプローブUOD a、17マーのオリゴヌクレオチドを作製した。

【0043】このようにして得られたオリゴヌクレオチド5 pmolをT4ポリヌクレオチドキナーゼバッファー〔50 mMトリス-塩酸 (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、4 mMのDTT、0.1 mMのEDTA、0.1 mM スペルミジン〕及び370キロボクレルの〔 γ -³²P〕ATP (アマシャム社製)の存在下、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡績社製) 8.5単位を用い、37℃で30分間反応させて、アイソトープ³²Pを取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製した。しかしながら本放射性オリゴヌクレオチドプローブを用い、種々の条件を検討してウリカーゼ遺伝子のクローニングを試みたが目的の遺伝子は取得できなかった。

【0044】次に、図5のD-15アミノ酸配列で、1アミノ酸残基目のAspから11アミノ酸残基目のPheに対応する合成DNAを作製した。この組合せは32マーのものを考えた場合27648通りも存在する。そこですべてのアミノ酸においてはコドンの3レター目にイノシンを用い、さらにSerの1レター目の部分はAとTの両方を用い、Serの2レター目の部分はCとGの両方を用いた計4通りの組み合わせに絞ったものを考案した。このアミノ酸配列から推定されるmRNAに相補的な図6の②、配列番号3に示すプローブUOD b、32マーのオリゴヌクレオチドを作製した。

【0045】このオリゴヌクレオチドについても前記と同様に、アイソトープ³²Pを取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製した。しかしながら本放射性オリゴヌクレオチドプローブを用いたものについても、種々の条件を検討してウリカーゼ遺伝子のクローニングを試みたが目的の遺伝子は取得できなかった。そこで鋭意思考努力した結果、図6の①、配列番号2に示すプローブUOD a、17マーのオリゴヌクレオチドを更に長くしたものを考案した。即ち図5のD-20アミノ酸配列の下線部分で、1アミノ酸残基目のAspから7アミノ酸残基目のThrに対応する合成DNAを作製した。この組合せは20マーのものを考えた場合256通りも存在してしまう。よってこの組み合わせを4種類に分け、20マーで64通りのオリゴヌクレオチドプローブを4本考案した。このアミノ酸配列から推定されるmRNAに相補的な図6の③、配列番号4に示すプローブUOD cと、図6の④、配列番号5に示すプローブUOD dと、図6の⑤、配列番号6に示すプローブUOD eと、図6の⑥、配列番号7に示すプローブUOD fを別々に作製した。

【0046】これらオリゴヌクレオチドについても前記と同様に、アイソトープ³²Pを取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製した。

【0047】

【実施例2】

ウリカーゼ遺伝子含有DNAのスクリーニング

参考例2で得たアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株遺伝子DNAライブラリー、すなわち平板寒天培地上のアンピシリン耐性コロニーの上に、ナイロンメンブレンフィルター〔マグナグラフナイロン (ミクロンセパレーション社製)〕を重ね、フィルター上に該コロニー菌体の一部を移行させた後、このフィルターをアルカリ変性溶液 (1.5 MのNaCl含有0.5 N-NaOH溶液) 中に5分間浸し、さらに中和溶液〔0.5 Mトリス-塩酸 (pH 7.0) 及び3 MのNaCl混合液〕に5分間浸漬後、乾燥させた。

【0048】次に、このフィルターを80℃で2時間加熱し、菌体中にあったプラスミドDNAをフィルターに固定した。さらに、このフィルターを、1.8 MのNaCl、0.18 Mクエン酸ナトリウム、0.05%ニリン酸ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%BSA及び0.01%サケ精子DNAを含有するプレハイブリダイゼーション溶液に浸し、37℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを、1.8 MのNaCl、0.18 Mクエン酸ナトリウム、0.05%ニリン酸ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%BSA及び0.002%大腸菌由来のトランスファーRNAを含有するハイブリダイゼーション溶液に浸した後、先に実施例1で得られた図6の③〜⑥に示した配列の放射性オリゴヌクレオチドプローブを別々に加え、42℃で一昼夜ハイブリダイゼーションを行った。

【0049】ハイブリダイゼーション後、1.8 MのNaCl、0.18 Mクエン酸ナトリウム、0.05%ニリン酸ナトリウムを含む洗浄液でフィルターを3回洗浄した後、45℃の洗浄液に10分間浸し、余分なプローブを洗い落とした。ついで、フィルターを風乾後、X線フィルム (富士写真フィルム社製、HR-H) に重ね、遮光下-80℃で24時間オートラジオグラフィを行った。

【0050】その後、フィルムを現像したところ、図6の④に示した配列の放射性オリゴヌクレオチドプローブを用いたものにおいてポジティブシグナルを示すコロニーを確認した。該コロニーを形成する組換え体E. coliに含まれるプラスミドに挿入されたDNAの制限酵素切断地図を図3に示した。該コロニーを、ウリカーゼをコードするDNAを含む形質転換体E. coli DH1-pUD2 (FERM P-15308) と命名し、その形質転換体E. coli DH1-pUD2中に含まれるベクタープラスミドはプラスミドpUD2と命名した。

【0051】

【実施例3】

ウリカーゼをコードするDNA塩基配列の決定
ベクタープラスミドpUOD2で形質転換したE. coli DH1から、ティール・マニアティスらの方法[「モレキュラー・クローニング：コールド・スプリング・ハーバー (Molecular Cloning: Cold Spring Harbor)」第86～94ページ(1982年)]によって、pUOD2 DNAを抽出した。このプラスミドの構成を示す模式図を図4に示す。該プラスミド中のアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株染色体由来の部位をジデオキシ法[「サイエンス (Science)」第214巻、第1205～1210ページ(1981年)]により、塩基配列を決定し、ウリカーゼをコードする全DNAが含まれていることを確認すると共に、その全塩基配列を決定し、少なくとも図2にて示される配列を含むものであることを確認した。

【0052】今回解析したウリカーゼのエンドプロテイナーゼ Asp-N処理断片アミノ酸配列とも同一フレームにおいて完全に一致した。

【0053】

【実施例4】

大腸菌内でのウリカーゼの活性発現

発明の実施の形態2で得られたウリカーゼをコードするDNAを含む形質転換体E. coli DH1-pUOD2をアンピシリン50μg/ml含有BHI培地に於て37℃一昼夜培養した後、培養液を15,000rpmで1分間遠心分離処理して沈澱を回収した。この沈澱に、該培養液と同量の10mMリン酸緩衝液(pH7.0)を加え、超音波破砕を行った。

【0054】ウリカーゼ活性の測定は、40mMリン酸緩衝液(pH7.0)、10mM尿酸(pH7.0)、1.5mM4-アミノアンチピリン、0.04%N,N'-ジメチルアニリン、10ユニットペルオキシダーゼを加えた反応液1mlを37℃に保温しておき、先に示した超音波破砕液を適宜希釈した後、20μl加えて正確に37℃で10分間反応させた。37mMクエン酸、126mMリン酸水素2ナトリウムに0.1MのEDTAを加えた反応停止液2mlを加えて565nmの吸光

配列

```

TGGATTTCACCTACCGAGGGAGTTAGCCATGACTGCCACCGCAACCTCA54
MetThrAlaThrAlaGluThrSer
15
ACCGGCACCAAGGTCGTGCTCGGACAGAACAGTACGGCAGGCCGAA102
ThrGlyThrLysValValLeuGlyGlnAsnGlnTyrGlyLysAlaGlu
101520
GTCGCGCTCGTCAGGTCACGCGCAATACCGCCGCGCACGAGATCCAG150
ValArgLeuValLysValThrArgAsnThrAlaArgHisGluIleGln
25303540

```

度を測定することによって、ウリカーゼ活性を定量した。なお、比較のためにpUC118をトランスフォーメーションしたE. coli DH1の破砕液についても前記と同様の処理を行い、ウリカーゼ活性を測定した。

【0055】その結果、驚くことにベクタープラスミドpUOD2を保持した形質転換微生物での活性は0.27U/mlも発現していたが、pUC118を持つものの活性は0U/mlであった。これより、ウリカーゼ活性をもつ形質転換体が得られていることが確認された。さらに得られたウリカーゼを単離・精製し、分子量、等電点、安定性が先に示したアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株と全く同一であったことなど、発現蛋白質の物理化学的性質を確認した。

【0056】

【発明の効果】本発明によるとアースロバクター・グロビホルミスFERM BP-360株由来の染色体DNAライブラリーから、ウリカーゼを発現する遺伝子DNAをスクリーニングし、これを用いて構築された発現ベクターの組換えプラスミドを例えばE. coliに属する微生物に導入することによって、得られた形質転換微生物は効率よくウリカーゼを生産することができる。

【0057】また、本発明によって、ウリカーゼの全アミノ酸配列及びこのアミノ酸をコードする遺伝子DNAの塩基配列が決定できたので、該酵素の基質及び補酵素特異性の変換や耐熱性の向上などのプロテインエンジニアリングが可能となった。

【0058】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 947塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

生物名: アースロバクター・グロビホルミス (Arthrobacter globiformis)

株名: FERM BP-360

配列の特徴: 31-936 E ウリカーゼ遺伝子

GAC CTG AAT GTC ACC TCG CAG CTG CGC GGC GAC TTC GAG GCC GCA CAC	198
Asp Leu Asn Val Thr Ser Gln Leu Arg Gly Asp Phe Glu Ala Ala His	
45 50 55	
ACC GCC GGC GAC AAC GCG CAC GTG GTC GCC ACC GAC ACG CAG AAG AAC	246
Thr Ala Gly Asp Asn Ala His Val Val Ala Thr Asp Thr Gln Lys Asn	
60 65 70	
ACC GTC TAC GCC TTC GCC CGC GAC GGC TTC GCC ACC ACC GAG GAG TTC	294
Thr Val Tyr Ala Phe Ala Arg Asp Gly Phe Ala Thr Thr Glu Glu Phe	
75 80 85	
CTG CTC CGG CTG GGC AAA CAC TTC ACC GAG GGC TTC GAC TGG GTA ACC	342
Leu Leu Arg Leu Gly Lys His Phe Thr Glu Gly Phe Asp Trp Val Thr	
90 95 100	
GGC GGC CGC TGG GCG GCG CAG CAG TTC TTC TGG GAC CGC ATC AAC GAC	390
Gly Gly Arg Trp Ala Ala Gln Gln Phe Phe Trp Asp Arg Ile Asn Asp	
105 110 115 120	
CAC GAC CAC GCC TTC TCC CGG AAC AAG AGC GAG GTC CGC ACC GCC GTG	438
His Asp His Ala Phe Ser Arg Asn Lys Ser Glu Val Arg Thr Ala Val	
125 130 135	
CTC GAG ATC TCG GGC AGC GAG CAG GCC ATC GTC GCC GGC ATC GAG GGC	486
Leu Glu Ile Ser Gly Ser Glu Gln Ala Ile Val Ala Gly Ile Glu Gly	
140 145 150	
CTG ACG GTC CTG AAG TCC ACC GGT TCG GAA TTC CAC GGC TTC CGC CGG	534
Leu Thr Val Leu Lys Ser Thr Gly Ser Glu Phe His Gly Phe Pro Arg	
155 160 165	
GAC AAG TAC ACC ACC CTG CAG GAA ACC ACC GAC CGT ATC CTC GCC ACG	582
Asp Lys Tyr Thr Thr Leu Gln Glu Thr Thr Asp Arg Ile Leu Ala Thr	
170 175 180	
GAT GTC AGC GCC CGC TGG CGC TAC AAC ACC GTC GAG GTT GAC TTC GAC	630
Asp Val Ser Ala Arg Trp Arg Tyr Asn Thr Val Glu Val Asp Phe Asp	
185 190 195 200	
GCC GTC TAC CGC AGC GTC CGC GGC CTG CTG CTC AAG GCC TTC GCC GAG	678
Ala Val Tyr Ala Ser Val Arg Gly Leu Leu Leu Lys Ala Phe Ala Glu	
205 210 215	
ACC CAC TCG CTG GCC CTG CAG CAG ACC ATG TAT GAG ATG GGC CGG GCC	726
Thr His Ser Leu Ala Leu Gln Gln Thr Met Tyr Glu Met Gly Arg Ala	
220 225 230	
GTC ATC GAG ACG CAC CGC GAA ATC GAC GAA ATC AAG ATG TCC CTG CGG	774
Val Ile Glu Thr His Pro Glu Ile Asp Glu Ile Lys Met Ser Leu Pro	
235 240 245	
AAC AAG CAC CAT TTC CTG GTG GAC CTG CAG CCC TTC GGA CAG GAC AAC	822
Asn Lys His His Phe Leu Val Asp Leu Gln Pro Phe Gly Gln Asp Asn	
250 255 260	
CGC AAT GAG GTG TTC TAC GCC GCC GAC CGT CCC TAC GGA CTG ATC GAA	870
Pro Asn Glu Val Phe Tyr Ala Ala Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Glu	
265 270 275 280	
GCC ACC ATC CAG CGC GAG GGC TCG CGC GCC GAC CAC CGC ATC TGG TCG	918
Ala Thr Ile Gln Arg Glu Gly Ser Arg Ala Asp His Pro Ile Trp Ser	
285 290 295	
AAC ATC GCC GGA TTC TGC TAG CCACATGC	947
Asn Ile Ala Gly Phe Cys ***	

300 302

【0059】

【配列表】

配列番号: 2

配列の長さ: 17塩基対

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の名称: ウリカーゼ遺伝子プローブ UODa

配列の特徴: Nはアデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

配列

GANCANCCNA TNTGGWSNAA NATNGCNGGN TT

【0061】

【配列表】

配列番号: 4

配列の長さ: 20塩基対

鎖の数: 一本鎖

配列

GAYTTCCGAAG CNGCNCAYAC 20

【0062】

【配列表】

配列番号: 5

配列の長さ: 20塩基対

鎖の数: 一本鎖

配列

GAYTTCCGAGG CNGCNCAYAC 20

【0063】

【配列表】

配列番号: 6

配列の長さ: 20塩基対

鎖の数: 一本鎖

配列

GAYTTTGAAG CNGCNCAYAC 20

【0064】

【配列表】

配列番号: 7

配列の長さ: 20塩基対

鎖の数: 一本鎖

配列

GAYTTTGAGG CNGCNCAYAC 20

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はウリカーゼのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】図2は図1のアミノ酸をコードするウリカーゼ遺伝子DNAの塩基配列を示す図である。

【図3】図3はベクタープラスミドpUOD2におけるアースロバクター・グロビホルミス (Arthrobacter globiformis) 由来の染色体DNAの制限酵素地図である。

配列 GAYTTYGARG CNGCNCA 17

【0060】

【配列表】

配列番号: 3

配列の長さ: 32塩基対

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の名称: ウリカーゼ遺伝子プローブ UODb

配列の特徴: Nはイノシン

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の名称: ウリカーゼ遺伝子プローブ UODc

配列の特徴: Nはアデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の名称: ウリカーゼ遺伝子プローブ UODd

配列の特徴: Nはアデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の名称: ウリカーゼ遺伝子プローブ UODe

配列の特徴: Nはアデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の名称: ウリカーゼ遺伝子プローブ UODf

配列の特徴: Nはアデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

【図4】図4はベクタープラスミドpUOD2の構造を示す模式図である。

【図5】図5はウリカーゼ精製標品のエンドプロテイナーゼ・Asp-N処理断片アミノ酸配列を解析したウリカーゼのアミノ酸配列を示す図である。下線で示した部分は作製したオリゴヌクレオチドプローブUODdに対応する領域である。

【図6】図6はオリゴヌクレオチドプローブの作製に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す図である。な

お、ここでのNはイノシンである。

【図7】図7は本発明で用いたウリカーゼ遺伝子発現ベ

クターの構築の流れを示す模式図である。

【図1】

```

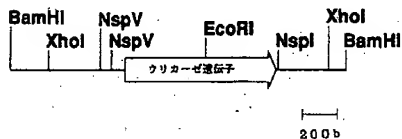
Met Thr Ala Thr Ala Glu Thr Ser Thr Gly Thr Lys Val Val Leu Gly Glu Asn Glu Tyr 20
Gly Lys Ala Glu Val Arg Leu Val Lys Val Thr Arg Asn Thr Ala Arg His Glu Ile Glu 40
Asp Leu Asn Val Thr Ser Glu Leu Arg Gly Asp Phe Glu Ala Arg His Thr Ala Gly Asp 60
Asn Ala His Val Val Ala Thr Asp Thr Glu Lys Asn Thr Val Tyr Ala Phe Ala Arg Asp 80
Gly Phe Ala Thr Thr Glu Glu Phe Leu Leu Arg Leu Gly Lys His Phe Thr Glu Gly Phe 100
Asp Trp Val Thr Gly Arg Trp Ala Ala Glu Glu Phe Thr Trp Asp Arg Ile Asn Asp 120
His Asp His Ala Phe Ser Arg Asn Lys Ser Glu Val Arg Thr Ala Val Leu Glu Ile Ser 140
Gly Ser Glu Glu Ala Ile Val Ala Gly Ile Glu Gly Leu Thr Val Leu Lys Ser Thr Gly 160
Ser Glu Phe His Gly Phe Pro Arg Asp Lys Tyr Thr Thr Leu Glu Glu Thr Thr Asp Arg 180
Ile Leu Ala Thr Asp Val Ser Ala Arg Trp Arg Tyr Asn Thr Val Glu Val Asp Phe Asp 200
Ala Val Tyr Ala Ser Val Arg Gly Leu Leu Lys Ala Phe Ala Glu Thr His Ser Leu 220
Ala Leu Glu Glu Thr Met Tyr Glu Met Gly Arg Ala Val Ile Glu Thr His Pro Glu Ile 240
Asp Glu Ile Lys Met Ser Leu Pro Asn Lys His Ile Phe Leu Val Asp Leu Glu Pro Phe 260
Gly Glu Asn Pro Asn Glu Val Phe Thr Ala Ala Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Glu 280
Ala Thr Ile Glu Arg Gly Ser Arg Ala Asp His Pro Ile Trp Ser Asn Ile Ala Gly 300
Phe Cys 302
  
```

【図2】

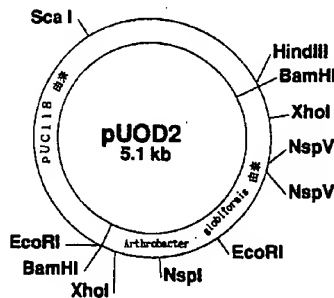
```

ATGACTGCGA CCGCAGAAC CTCAGGCGC ACCAAGTCTG TCTTGCGA GACCACTAC 80
GGCAAGGCGG AMTCCGCTT CTTAAGGTC AGCGCAATA CGCGCGCGA CGAGCTCAG 120
GACCTGATG TCACTCGCA CCGCGCGCG GACTTGAGG CGGCACACG CCGCGCGAG 180
AACCGGACG TGTGCGCG CACACGCGG AAGACACCG TCTACGCTT CGCGCGCGG 240
GGCTTGCGA CGACGAGGA GTTCTGCTC CGGCTGCTG AAGACTTAC CGAGGCTTC 300
GACTGGTAA CCGCGCGCGG CTGCGCGCG CAGCACTTT TCTGCGCGC CATCAACAG 360
CAGCAGCAG CTTCTCGCG GACACAGAG GAGCTCGCA CGCGCTGTT CGAGATCTG 420
GGCAGGAGC AGCGCATCT CGCGCGGATC GAGGCGCTG CGGCTGCTG GTCCAGGCT 480
TGGGATTCG AGCGCTTCC GCGCGCAGG TACACACCG TCGACGAAC CAGCGAGCT 540
ATCTGCGCA CGAGTTCAG CGCGCGTGG CCTACAGCA CGTGGAGCT TCACTTGAC 600
CGGCTGAGG CGAGCGTCCG CGCGCTGCT CTCAGGCGCT TCGCGCGAG CCACTGCTG 660
CGGCTGCGC AGACATGTA TCACTGCGC CGCGCGCTCA TCGAGCGCA CGCGCAATC 720
GACCAATCA AGATGCTCT CGCGACAGG CAGCACTTC TGTGAGACT CGAGCGCTT 780
CGACAGACA ACCGAGTGA GTTCTTAC GCGCGCGAG CTCTCTAGG ACTGATGAA 840
CGCAGCATC AGCGGAGGG CTCGCGCGC GACACCGGA TGTGTCGAA CATCGCGGA 900
TTCTTC 906
  
```

【図3】



【図4】



【図5】

エンドプロテイナーゼ・A s p-N処理断片D-14アミノ酸配列
Asp-Gly-Phe-Ala-Thr-Thr-Glu-Glu-Phe-Leu-Leu

エンドプロテイナーゼ・A s p-N処理断片D-15アミノ酸配列
Asp-His-Pro-Ile-Trp-Ser-Asn-Ile-Ala-Gly-Phe

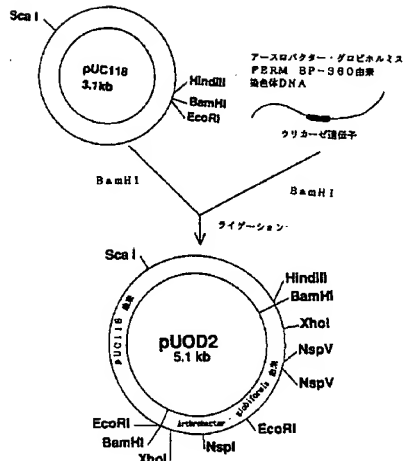
エンドプロテイナーゼ・A s p-N処理断片D-20アミノ酸配列
Asp-Phe-Glu-Ala-Ala-His-Thr-Ala-Gly

エンドプロテイナーゼ・A s p-N処理断片D-37アミノ酸配列
Asp-Trp-Val-Thr-Gly-Gly-Arg

【図6】

①オリゴヌクレオチドプローブUODaの塩基配列	
GA C T T C G A A G C A G C A C A	17
T T G T C	
C C	
②オリゴヌクレオチドプローブUODbの塩基配列	
C A N C A N C C N A T N T G G T C N A A	20
A G	
N A T N C C N G C N T T	32
③オリゴヌクレオチドプローブUODcの塩基配列	
GA C T T C G A A G C A G C A C A C A C	20
T T C	
C C	
④オリゴヌクレオチドプローブUODdの塩基配列	
GA C T T C G A G G C A G C A C A C A C	20
T T C	
C C	
⑤オリゴヌクレオチドプローブUODEの塩基配列	
GA C T T T G A A G C A G C A C A C A C	20
T T C	
C C	
⑥オリゴヌクレオチドプローブUODfの塩基配列	
GA C T T T G A G G C A G C A C A C A C	20
T T C	
C C	

【図7】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:06)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/06

C 1 2 R 1:19)